

БІААРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

УДК 616.15–06:615.38.033.1:577.3

А. В. ЛАПКО, Д. Н. КИСЛАЯ, Е. М. ЕРМОЛА, Д. А. МАКАРЕВИЧ, В. П. ГОЛУБОВИЧ

РАЗРАБОТКА ГЕМОСОРБЕНТОВ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ IgG НА ОСНОВЕ ОЛИГОПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: gormoshkina@gmail.com, kislaja-dashka@rambler.ru, ermola.e@tut.by, demkarevich@yandex.ru,
golubovich@iboch.bas-net.by

Рассматривается возможность создания новых гемосорбентов на основе олигопептидных аналогов эпитопов протеина А *Staphylococcus aureus* и полиэтиленовой матрицы. Предложена удобная методика получения гемосорбентов и проведены первичные экспериментальные испытания.

Ключевые слова: иммунсорбция, протеин А, олигопептидный аналог.

A. V. LAPKO, D. N. KISLAYA, E. M. ERMOLA, D. A. MAKAREVICH, V. P. GOLUBOVICH

DEVELOPMENT OF IgG BINDING HEMOSORBENTS BASED ON OLIGOPEPTIDE LIGANDS

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: gormoshkina@gmail.com, kislaja-dashka@rambler.ru, ermola.e@tut.by, demkarevich@yandex.ru,
golubovich@iboch.bas-net.by

The possibility for development of new hemosorbents based on oligopeptide analogues of *Staphylococcus aureus* protein A epitopes and polyethylene matrix, is discussed. A convenient method for hemosorbent preparation has been developed and primary tests have been performed.

Keywords: immunosorption, hemosorbent, protein A, oligopeptide analogue.

Введение. Для коррекции состояний, связанных с повышенным титром иммуноглобулинов класса G(IgG) в крови человека, успешно используется метод иммунсорбции [1]. К областям применения данного метода относятся трансплантология, онкология и, безусловно, лечение заболеваний аутоиммунной природы [2]. Известно, что удаление общего пула IgG посредством использования иммунсорбентов значительно улучшает прогноз при лечении состояний, связанных с повышенным уровнем IgG в крови. В клинической практике используются IgG-гемосорбенты на основе различных активных лигандов, которые можно условно разделить на две группы. К первой относятся сорбенты, основным действующим веществом которого является высокомолекулярное соединение. Это сорбенты на основе поликлональных антител к IgG человека и протеина А *Staphylococcus aureus* [4]. Вторая группа – это сорбенты с аминокислотами триптофан и фенилаланин в качестве активного вещества [5, 6]. Помимо этого, известны также сорбенты с использованием производных триазины [7]. Однако все сорбенты с вышеперечисленными лигандами имеют ряд существенных недостатков. Так, например, для сорбентов на основе антител и протеина А характерны высокая стоимость, сложность и специфичность получения (в зависимости от использования нативного или рекомбинантного белка, или его доменов), а также невозможность их стерилизации путем автоклавирования. Немаловажный отрицательный фактор этих сорбентов – высокая иммуногенность, подтверждением этого факта является множество статей с описанием побочных реакций вплоть до летальных исходов [8–10]. Вследствие чего один из сорбентов на основе протеина А (ProSORBA; ImreCorp, Сиэтл, США) снят с производства

с 2006 года [11]. Для сорбентов, в качестве лигандов для которых выступают аминокислоты и производные триазина, характерны способность выдерживать длительное хранение и автоклавирование, более простой и дешевый способ их получения, но они отличаются в худшую сторону по специфичности связывания IgG по сравнению с описанными выше иммуносорбентами. Поэтому перспективным является создание иммуносорбента, не уступающего по показателям сорбентам с протеином А, но с более простым и быстрым способом получения, а следовательно, и менее затратным в финансовом отношении. Для оптимального по всем параметрам результата нами предложены варианты создания гемосорбентов на основе олигопептидных аналогов эпитопов протеина А *Staphylococcus aureus*.

Методика эксперимента. Для получения вариантов олигопептидных аналогов активного центра протеина А *Staphylococcus aureus* были проанализированы с помощью методов конформационного анализа структуры комплекса протеин А – Fc-фрагмент иммуноглобулинов класса G (структуры 1FC1 и 1FC2). Поиск контактов взаимодействия протеина А с Fc-фрагментом иммуноглобулина G проводили в структуре, полученной с помощью Программы оптимизации белков и счета конформаций, разработанной на базе лаборатории прикладной биохимии Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Проведен химический синтез выделенных олигопептидных аналогов активного центра протеина А состава Gln–Phe–Phe–Tyr–OMe и Gln–Ile–Asn–Ser–OMe. Основным методом образования пептидной связи был выбран карбодиимидный, в качестве конденсирующего агента использовали диизопропилкарбодимид, противорацемической добавки – 1-оксибензотриазол. Для блокирования α-аминогрупп использовали *трет*-бутилоксикарбонильную защиту. Ее отщепление проводили обработкой пептидов 3,5–5,0 н. раствором HCl в этилацетате. Карбоксильные группы блокировали путем образования метиловых эфиров. Разработанная схема синтеза включает 6 синтетических стадий (рисунок).

Чистота и первичная структура созданных пептидов подтверждены методами масс-спектрометрии, аминокислотного анализа, ВЭЖХ, ТСХ.

Для получения образцов сорбентов были использованы активированные ионизирующим излучением гранулы полиэтилена с привитой акриловой кислотой, к которым присоединялись олигопептидные лиганды (1) Gln–Phe–Phe–Tyr–OEt и (2) Gln–Ile–Asn–Ser–OMe. Для концентрации 1 мг на 5 гранул взвешивали 2 мг пептидов и растворяли их в 2 мл смеси диметилформалида

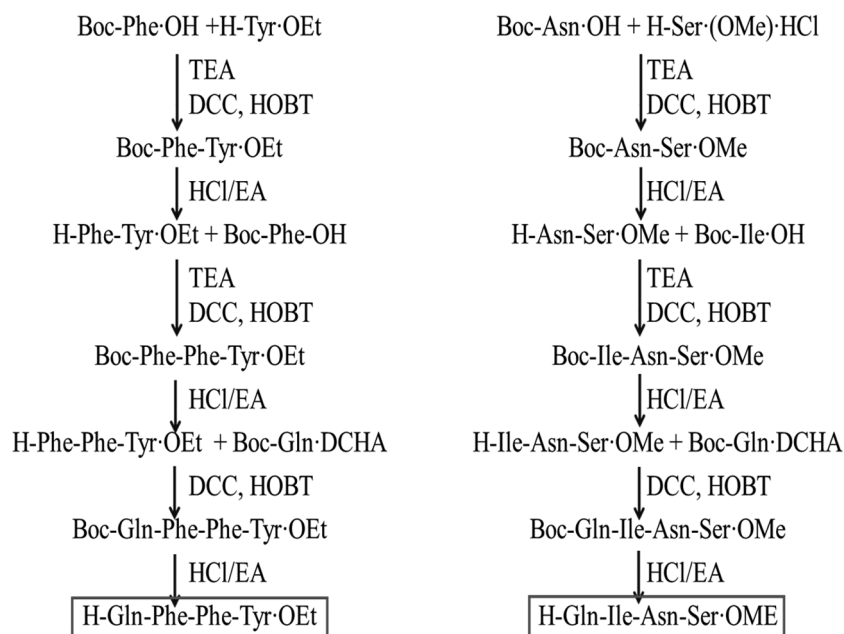


Схема синтеза олигопептидных аналогов активного центра протеина А

(ДМФ) и воды (1:1). Затем к смеси с пептидом (1) добавляли 0,741 мкл диизопропилэтиламина (ДИЕА) и 0,936 мкл диизопропилкарбодиимида (ДИПК); для смеси с пептидом (2) – 0,651 мкл ДИЕА и 1,231 мкл ДИПК. Отобрали 1 мл смеси для последующего анализа (нулевой контроль). Следовательно, концентрация пептидов в полученном растворе составляет 1 мг/мл. Далее к раствору добавляли 5 гранул отмытого полиэтилена с привитой акриловой кислотой, после чего следовала инкубация на шейкере в течение 12 ч. Для анализа количества несвязавшегося пептида была отобрана проба раствора. Гранулы отмывали дистиллированной водой. Для концентрации пептидов 5 мг на 5 гранул взвешивали 6 мг пептидов и растворяли в 1,2 мл смеси ДМФ и воды (1:1). Затем к смеси с пептидом (1) добавляли 2,222 мкл диизопропилэтиламина (ДИЕА) и 2,808 мкл диизопропилкарбодиимида (ДИПК); для смеси с пептидом (2) – 1,953 мкл ДИЕА и 3,692 мкл ДИПК. Для последующего контроля связывания пептидов с матрицей отбирали 0,2 мл данного раствора. Далее к раствору добавляли 5 гранул отмытого полиэтилена с привитой акриловой кислотой, с последующими инкубацией, отбором пробы раствора для анализа несвязавшегося пептида и отмыванием дистиллированной водой.

В качестве функциональной оценки связывания полученных образцов сорбентов с Fc-фрагментом иммуноглобулинов использовали иммуноферментный анализ [12]. Для этого в качестве иммуноферментной тест-системы был использован набор «IgG общий – ИФА – БЕСТ» фирмы «Вектор Бест» (Новосибирск, Россия), предназначенный для иммуноферментного определения концентраций общего IgG в сыворотке крови и других биологических жидкостях человека.

Для определения наличия и степени связывания с Fc-фрагментом общего IgG исследуемых тетрапептидов в качестве активных лигандов использовали твердофазный метод иммуноанализа, основанный на принципе «сэндвич» (двухцентровый иммуноанализ). Непосредственно перед проведением анализа получали искомые варианты комплекса, который состоит из одной гранулы каждого из сорбентов, а также гранул матрицы без лиганда в качестве контроля и Fc-фрагмента общего IgG в различных соотношениях 12:1; 6:1; 12:5; 6:5 соответственно. Для этого использовали рабочий буфер из набора, образцы сорбентов с известной концентрацией тетрапептидов (1 и 5 мг/мл) и IgG с концентрацией 12 и 6 мг/мл. Данный комплекс инкубировали при 37 °C в течение 30 мин.

Дальнейший анализ проводили в две стадии. На первой стадии калибровочные образцы с известной концентрацией IgG и анализируемые образцы комплекса сорбент–Fc-фрагмент IgG, а также контрольные образцы (нулевой контроль и контрольные образцы гранул матрицы без лигандов) инкубировались в лунках стрипированного планшета с иммобилизованными моноклональными антителами (MAb) к IgG. Затем планшет отмывали промывочным буфером. На второй стадии связавшийся в лунках IgG и комплекс IgG-тетрапептид обрабатывали конъюгатом MAb к легким (лямбда и каппа) цепям иммуноглобулинов человека с пероксидазой. После отмытия избытка конъюгата образовавшиеся иммунные комплексы «иммобилизованные MAb–IgG–конъюгат» выявляли ферментативной реакцией пероксидазы с перекисью водорода в присутствии хромогена (тетраметилбензидина). После остановки пероксидазной реакции стоп-регентом результаты учитывались фотометрически (многоканальный спектрофотометр Ф300, РУПП «Витязь»).

Результаты исследований и их обсуждение. Смоделированные тетрапептидные аналоги состава Gln–Phe–Phe–Tyr–OEt и Gln–Ile–Asn–Ser–OMe, синтезированные с помощью классических методов пептидного синтеза, использованы для создания сорбентов. Предложенные схемы синтеза Gln–Phe–Phe–Tyr–OEt и Gln–Ile–Asn–Ser–OMe являются наиболее оптимальными и имеют высокий выход целевого продукта (47 и 40%).

При проведении качественной оценки функции связывания полученных сорбентов на основе тетрапептидных аналогов активного центра протеина A *Staphylococcus aureus* с Fc-фрагментом иммуноглобулинов с помощью иммуноанализа установлено, что блокированный активными лигандами на поверхности гранул Fc-фрагмент IgG не связывается с иммобилизованными антителами, характеризующимися аффинностью к Fc-фрагменту. В данном случае определяемая концентрация иммуноглобулина G в комплексе с сорбентами будет обратно пропорциональна проценту ингибирования Fc-фрагмента антитела, т. е. чем выше полученные в тесте значения

концентрации IgG, тем менее интенсивно связывание сорбентов с Fc-фрагментом. Интенсивность окраски хромогена при этом пропорциональна концентрации IgG в анализируемом образце и обратно пропорциональна количеству образовавшегося комплекса антитела с сорбентами, т. е. чем выше интенсивность окраски в конце анализа, тем хуже исследуемые сорбенты связывают IgG. В результате проведения иммуноанализа было отмечено, что сорбент с пептидом Gln–Phe–Phe–Tyr–OEt в качестве активного лиганда связывает 86% внесенного в раствор иммуноглобулина G. Сорбент с пептидом Gln–Ile–Asn–Ser–OMe не проявил никакой активности в отношении IgG, т. е. связывания с иммуноглобулином не было установлено.

В качестве подтверждения результатов анализа проводили исследование ряда контрольных образцов. Контрольные образцы исследуемого IgG и IgG из набора дали значения, соответствующие исходным. Нулевой контроль показал, что взаимодействия тетрапептидов с моноклональными антителами (как с иммобилизованными, так и меченными пероксидазой), а также гранул матрицы с иммуноглобулином не наблюдается.

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что при проведении иммуноферментного анализа образуется устойчивый комплекс Fc-фрагмента иммуноглобулина G и полученного сорбента с Gln–Phe–Phe–Tyr–OEt в качестве лиганда. Причем результаты связывания IgG сорбентом не уступают зарубежным аналогам (Prosorba, Immunosorba). Таким образом, сорбент с лигандом Gln–Phe–Phe–Tyr–OEt является функционально активным в отношении Fc-фрагмента иммуноглобулина G.

Закключение и выводы. В результате проведенных с помощью Программы оптимизации белков и счета конформаций исследований установлено, что тетрапептиды Gln–Phe–Phe–Tyr–OEt и Gln–Ile–Asn–Ser–OMe предположительно являются участками активного центра протеина A для связывания Fc-фрагмента иммуноглобулинов класса G, для получения которых разработана схема химического синтеза. Разработана оптимальная методика создания сорбента на основе гранул полиэтиленовой матрицы и синтезированных пептидов. Проведены исследования одной из важнейших функциональных характеристик полученных сорбентов, а именно их связывание с Fc-фрагментом иммуноглобулинов класса G. Полученные данные показывают, что один из полученных сорбентов является функционально активным в отношении иммуноглобулинов класса IgG.

Список использованной литературы

1. Bosch, T. Therapeutic apheresis – state of the art in the year 2005 / T. Bosch // Ther. Apher. Dial. – 2005. – Vol. 9, N 6. – С. 459–468.
2. Stummvoll, G. H. IgG immunoadsorption reduces systemic lupus erythematosus activity and proteinuria: a long term observational study / G. H. Stummvoll [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2005. – Vol. 64, N 7. – С. 1015–1021.
3. Braun, N. Immunoadsorption onto protein A induces remission in severe systemic lupus erythematosus // N. Braun [et al.] // Nephrol. Dial. Transplant. – 2000. – Vol. 15, N 9. – С. 1367–1372.
4. Hirata, N. Immusorba TR and PH / N. Hirata, T. Kuriyama, N. Yamawaki // Ther. Apher. Dial. – 2003. – Vol. 7, N 1. – С. 85–90.
5. Li, R. Design, synthesis, and application of a protein A mimetic / R. Li [et al.] // Nat. Biotechnol. – 1998. – T. 16, N 2. – С. 190–195.
6. Lowe, C. R. Design and application of bio-mimetic dyes in biotechnology / C. R. Lowe [et al.] // J. Chromatogr. – 1986. – N 376. – С. 121–130.
7. Teng, S. F. Affinity chromatography on immobilized «biomimetic» ligands. Synthesis, immobilization and chromatographic assessment of an immunoglobulin G-binding ligand / S. F. Teng [et al.] // J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl. – 2000. – Vol. 740, N 1. – С. 1–15.
8. Huestis, D. W. Adverse clinical effects of immune sorption with staphylococcal protein A columns / D. W. Huestis, F. S. Morrison // Transfus. Med. Rev. – 1996. – Vol. 10, N 1. – С. 62–70.
9. Snyder, H. W. Jr. Experience with protein A-immunoadsorption in treatment-resistant adult immune thrombocytopenic purpura / H. W. Snyder [et al.] // Blood. – 1992. – Vol. 79, N 9. – С. 2237–2245.
10. Christie, D. J. Treatment of refractoriness to platelet transfusion by protein A column therapy / D. J. Christie [et al.] // Transfusion. – 1993. – Vol. 33, N 3. – С. 234–242.
11. Eustice, C. The Everything Health Guide to Arthritis / C. Eustice, S. J. Zashin. – Everything Books, 2007.
12. Егоров, А. М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров, А. П. Осипов, Б. Б. Дзантиев, Е. М. Гаврилова. – М., 1991.

Поступила в редакцию 29.05.2015